丁酸梭菌对肉仔鸡饲料加工过程及消化道环境的耐受性研究[1]

贾丽楠　崔　嘉　陈宝江*

（河北农业大学动物科技学院，保定 071001）

摘　要：本试验通过模拟肉仔鸡饲料制粒条件及其消化道环境，研究丁酸梭菌在饲料制粒过程中及在肉仔鸡消化道内对不良环境的耐受性。试验分别对丁酸梭菌的温度、压力、人工胃液及肠道消化酶耐受性进行评价。温度耐受性试验：将含丁酸梭菌试验饲粮在 85 ℃的条件下分别处理 2.5、5.0、7.5 min，对照组不作处理。压力耐受性试验：将丁酸梭菌试验饲粮分别在 0.20、0.30、0.40 MPa 压力下处理 5 min，对照组不作处理。人工胃液耐受性试验：将含丁酸梭菌试验饲粮在 pH 分别为 2.00、3.00、4.00 的人工胃液中处理 48 min，对照组以 pH 为 7.00 的磷酸盐缓冲液（PBS）替代人工胃液。肠道消化酶耐受性试验：将含丁酸梭菌试验饲粮用 pH 为 3.00 的人工胃液处理 48 min 后，再在肠道消化酶混合液中处理 198 min，对照组以 pH 为 7.00 的 PBS 替代肠道消化酶。每组均设 3 个重复。试验结束后平板计数法检测试验饲粮的丁酸梭菌活菌数，计算存活率。结果表明：85 ℃高温处理 2.5、5.0、7.5 min 后丁酸梭菌的存活率分别为 70.43%、52.69%、46.35%；0.20、0.30、0.40 MPa 压力下处理 5 min 后丁酸梭菌的存活率分别为 64.38%、87.14%、101.74%；pH 为 2.00、3.00、4.00 的人工胃液处理 48 min 后丁酸梭菌的存活率分别为 113.27%、123.07%、78.52%；经肠道消化酶混合液处理 198 min 后丁酸梭菌的存活率为 47.71%。结果表明，丁酸梭菌能够耐受肉仔鸡饲料加工过程中的高温、高压环境，对人工胃液有较好的耐受性，但对肠道消化酶的耐受性较低。

关键词：丁酸梭菌；耐受性；存活率

中图分类号：S816　　　　文献标识码：A　　　　文章编号：

收稿日期：2017-03-17

基金项目：河北省教育厅项目（ZD2016110）

作者简介：贾丽楠（1992—），女，河北秦皇岛人，硕士研究生，研究方向为单胃动物营养。E-mail: 18730283855@163.com

*通信作者：陈宝江，教授，博士生导师，E-mail: chenbaojiang@vip.sina.com

丁酸梭菌是一种肠道厌氧益生菌，具有良好的促进动物肠道发育及提高畜禽生产性能的效果，是一种能够广泛应用于畜禽生产的新型绿色饲料添加剂。对于活菌型饲料添加剂而言，其对制粒及消化道极端环境的耐受性高低也就决定了其开发利用的可行性及在畜禽生产中应用的有效性。丁酸梭菌生长代谢后期能够形成芽孢，芽孢具有新陈代谢缓慢、含水量低、抗逆性强的特点[1]。目前有少量关于丁酸梭菌抗逆性的研究发现丁酸梭菌具有一定的耐高温、耐胃酸、耐胆盐特性[2-6]。本试验通过模拟饲料制粒生产及肉仔鸡的消化道环境，对丁酸梭菌对温度、压力、人工胃液及肠道消化酶的耐受性进行评价，旨在探究丁酸梭菌在畜禽饲料中应用的可能性及影响因素。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验用丁酸梭菌为粉剂，活菌数为 2×10^{11} CFU/g，购自北京博创生物科技公司。

试验用主要试剂如下：TSN 琼脂，购自青岛海博生物技术有限公司；胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、磷酸盐缓冲液，购自北京奥博星生物技术有限责任公司；禽胆盐，购自凯玛生化有限公司）。

试验用仪器如下：超净工作台（上海博讯实业有限公司）、精密型 pH 计（德国德图）、恒温水浴振荡器（SHA-B，湖南力辰仪器科技有限公司）、恒温培养箱（MCO-15AC，日本三洋）、厌氧培养罐（C-32，日本三菱）、厌氧产气袋（C-35，日本三菱）、真空压力瓶（西贝实验）。

本试验采用玉米-豆粕型肉仔鸡基础饲粮，按中华人民共和国农业行业标准NY/T 33-2004 并结合肉鸡养殖情况配制，基础饲粮组成及营养水平见表 1。将肉仔鸡基础饲粮在 160 ℃条件下高温干热灭菌 150 min，冷却后调整水分至 17%~18%，将丁酸梭菌菌粉与基础饲粮混合制得含有丁酸梭菌活菌数约 10^9 CFU/kg的试验饲粮。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis)　　%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	51.68
豆粕 Soybean meal	41.00
豆油 Soybean oil	3.00
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.90
石粉 Limestone	1.10
食盐 NaCl	0.37
L-赖氨酸盐酸盐 *L*-Lys·HCl	0.05
DL-蛋氨酸 *DL*-Met	0.19
预混料 Premix[1)]	0.71
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]	
代谢能 ME/(MJ/kg)	12.62
粗蛋白质 CP	21.84
钙 Ca	1.00
有效磷 AP	0.48
赖氨酸 Lys	1.40
蛋氨酸 Met	0.56

[1)]预混料为每千克饲粮提供Premix provided the following per kg of the diet:Fe (as ferrous sulfate) 60.91 mg，Cu (as copper sulfate) 6.01 mg，Zn (as zinc sulfate) 65.75 mg，Mn (as manganese sulfate) 62.3 mg，I (as potassium iodide) 0.9 mg，Se (as sodium selenite) 0.21 mg，VA 6 141.5 IU，VD_3 1 789.2 IU，VE 7.99 mg，VK 1.82 mg，VB 10.65 mg，VB_2 3.93 mg，VB_6

2.08 mg，VB_{12} 0.01 mg，烟酸 nicotinic acid 18.06 mg，泛酸钙 calcium pantothenate 6.65 mg，叶酸 folic acid 0.59 mg，生物素 biotin 0.07 mg，胆碱 choline chloride 332.28 mg。

2)粗蛋白质为实测值，其他营养水平为计算值。CP was a measured value, while the other nutrient levels were calculated values.

1.2 试验方法

1.2.1 丁酸梭菌的高温耐受性试验

采用水浴模拟制粒温度，取试验饲粮于 85 ℃[7]水浴中分别作用 2.5、5.0、7.5 min，对照组试验饲粮不作处理，每组设 3 个重复。将各组试验饲粮进行梯度稀释平板计数，测出丁酸梭菌活菌数，计算存活率。

1.2.2 丁酸梭菌的高压耐受性试验

模拟制粒压力，取试验饲粮置于真空压力瓶中，分别向瓶中通入氮气(N_2)至瓶内压力分别达到 0.20、0.30、0.40 MPa[8]，在此压力下处理 5 min，对照组试验饲粮不作处理，每组设 3 个重复。将各组试验饲粮进行梯度稀释平板计数，测出丁酸梭菌活菌数，计算存活率。

1.2.3 丁酸梭菌的人工胃液耐受性试验

人工胃液的配制：以 pH 7.00 的磷酸盐缓冲液（PBS）为基础，再用 37%的盐酸将 pH 分别调至 2.00、3.00、4.00，按 0.89 U/mL 的比例添加胃蛋白酶[8]，充分溶解后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，备用。

模拟肉鸡胃内消化环境，评价丁酸梭菌的人工胃液耐受性。取试验饲粮 1 g 于 250 mL 灭菌三角瓶中，准确加入无菌的 pH 为 2.00、3.00、4.00 的人工胃液各 9 mL，对照组加入 pH 为 7.00 的 PBS 9 mL，每组设 3 个重复；充分混合后放入 41 ℃恒温水浴振荡器，设定转速为 120 r/min，5 min 后开始计时，48 min[9]后取出。将人工胃液处理后的试验饲粮 4 000 r/min 离心后弃去上清收集沉淀，用无菌 PBS 清洗 3 次后用 9 mL PBS 重悬沉淀，梯度稀释平板计数，测出丁酸梭菌活菌数，计算存活率。

1.2.4　丁酸梭菌的肠道消化酶耐受性试验

肠道消化酶混合液的配制：将配制好的 PBS 调 pH 至 6.00，按每毫升 PBS 中含有淀粉酶 780.76 U、胰蛋白酶 1.09 U、糜蛋白酶 0.04 U、脂肪酶 80.36 U 的比例[10]配制肠道消化酶混合液。充分溶解后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，现用现配。

模拟肠道消化环境，评价丁酸梭菌的肠道消化酶耐受性。取 pH 为 3.00 的人工胃液处理 48 min 后的试验样品 1 mL，离心后弃去上清收集沉淀，用无菌 PBS 清洗 3 次后加入 9 mL 肠道消化酶混合液，对照组加入 pH 为 7.00 的 PBS 9 mL，每组设 3 个重复；充分混匀后放入 41 ℃恒温水浴振荡器，设定转速为 120 r/min，5 min 后开始计时，198 min[10]后取出。将肠道消化酶混合液处理后的试验饲粮 4 000 r/min 离心后弃去上清收集沉淀，用无菌 PBS 清洗 3 次后用 9 mL PBS 重悬沉淀，梯度稀释平板计数，测出丁酸梭菌活菌数，计算存活率。

1.3　数据统计

采用 Excel 2003 对所有试验数据进行初步整理并计算存活率，使用 SPSS 19.0 中的单因素方差分析（one-way ANOVA）对活菌数进行差异显著性分析，当存在显著差异时用 Duncan 氏法多重比较检验组间差异显著性。$P<0.05$ 表示差异显著。

2　结果与分析

2.1　丁酸梭菌的高温耐受性

如表 2 所示，丁酸梭菌对高温具有一定的耐受性，但是对持续长时间的高温耐受性不佳。丁酸梭菌经 85 ℃处理 2.5、5.0、7.5 min 后活菌数均与对照组差异显著（$P<0.05$）。随着处理时间的增加，存活率逐渐下降，但下降的幅度逐渐减小。虽然在活菌数上各试验组与对照组均存在显著差异（$P<0.05$），但应考虑到丁酸梭菌的活菌数基础数值高，而高温并未使其活菌数在数量级上发生改变。

表 2　高温对丁酸梭菌活菌数及存活率的影响

Table 2　Effects of high temperature on viable count and livability of *Clostridium butyricum*

项目 Items	组别 Groups			
	对照 Control	2.5 min	5.0 min	7.5 min
活菌数 Viable count/（lgN/kg）	8.80±0.03[a]	8.65±0.03[b]	8.52±0.05[c]	8.47±0.08[c]
存活率 Livability/%	100.00	70.43	52.69	46.35

对于活菌数，同行数据肩标相同字母表示差异不显著（P>0.05），不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。

For viable count, values in the same row with the same letter superscripts mean no significant difference（P>0.05）, while with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05). The same as below.

2.2 丁酸梭菌的高压耐受性

如表 3 所示，0.20、0.30 MPa 组丁酸梭菌的活菌数较对照组显著降低（P<0.05），0.30 MPa 组丁酸梭菌的活菌数与对照组差异不显著（P<0.05）。0.20 MPa 组丁酸梭菌的存活率最低，为 64.38%；0.30、0.40 MPa 组丁酸梭菌的存活率逐渐升高，分别为 87.14%、101.74%。

表 3　高压对丁酸梭菌活菌数及存活率的影响

Table 3　Effects of high pressure on viable count and livability of *Clostridium butyricum*

项目 Items	组别 Groups			
	对照 Control	0.20 MPa	0.30 MPa	0.40 MPa
活菌数 Viable count/（lgN/kg）	8.80±0.05[a]	8.60±0.05[c]	8.74±0.03[b]	8.80±0.03[a]

存活率 Livability/%	100.00	64.38	87.14	101.74

2.3 丁酸梭菌的人工胃液耐受性

如表 4 所示，各试验组丁酸梭菌的活菌数均与对照组差异不显著（P>0.05），但 pH 2.00 和 3.00 组丁酸梭菌的存活率略高于对照组。

表 4 人工胃液对丁酸梭菌活菌数及存活率的影响

Table 4 Effects of artificial gastric juice on viable count and livability of *Clostridium butyricum*

项目 Items	组别 Groups			
	对照 Control	pH 2.00	pH 3.00	pH 4.00
活菌数 Viable count/（lgN/kg）	8.45±0.08^{ab}	8.48±0.16^{ab}	8.53±0.11^{a}	8.35±0.04^{b}
存活率 Livability/%	100.00	113.27	123.07	78.52

2.4 丁酸梭菌的肠道消化酶耐受性

如表 5 所示，丁酸梭菌经肠道消化酶处理后活菌数与对照组相比差异显著（P<0.05），肠道消化酶处理后丁酸梭菌的存活率仅为 47.71%。

表 5 肠道消化酶对丁酸梭菌活菌数及存活率的影响

Table 5 Effects of intestinal digestive enzyme and viable count and livability of *Clostridium butyricum*

项目 Items	组别 Groups

	对照 Control	肠道消化酶 Intestinal digestive enzyme
活菌数 Viable count/（lgN/kg）	8.31±0.09[a]	7.99±0.03[b]
存活率 Livability/%	100.00	47.71

3 讨 论

3.1 丁酸梭菌的高温耐受性

关于丁酸梭菌对高温耐受性的研究，研究者的方法不尽相同。王腾浩[2]将丁酸梭菌菌液置于不同温度下水浴 15 min，处理温度低于 75 ℃时，其存活率能保持在 84.23%以上，而当温度上升至 80 ℃时存活率仅为 27.41%；谢树贵[3]的研究表明，丁酸梭菌菌液经 80 ℃处理 30 min 后存活率为 6.48%。但以上研究均为丁酸梭菌在液体环境下进行的温度耐受性试验，而本研究旨在讨论在饲料制粒工艺条件下，即丁酸梭菌菌粉混合肉仔鸡基础饲粮情况下对温度的耐受性。研究结果表明，在 85 ℃环境下处理 2.5 min 后丁酸梭菌的存活率为 70.43%，随着温度的升高，丁酸梭菌的存活率逐渐下降。因此可知，饲料调制及制粒时，高温会影响丁酸梭菌的活性，时间过长会造成丁酸梭菌的大量灭活，影响其使用效果。

3.2 丁酸梭菌的高压耐受性

关于丁酸梭菌对高压耐受性的研究未见报道，但是确有报道指出某些芽孢对高压环境有一定的抗性[11]。本试验结果表明，0.20、0.30 MPa 压力下处理丁酸梭菌 5 min 后活菌数显著低于对照组，而 0.40 MPa 压力下处理丁酸梭菌 5 min 后，其活菌数与对照组相比差异不显著。由此可知，丁酸梭菌能够耐受一定范围的制粒压力。

3.3 丁酸梭菌的人工胃液耐受性

益生菌对消化道酸性环境的胁迫具有一定的应激反应，以保证其在消化道酸性环境的作用下得以存活[12]。王腾浩[2]、廖秀冬[4]的试验报道，丁酸梭菌在胃酸处理后其存活率均有不

同程度的下降，但差异不显著。在本试验中，pH 为 2.00、3.00、4.00 的人工胃液处理 48 min 后，各试验组丁酸梭菌的活菌数与对照组相比均差异不显著，说明丁酸梭菌具有一定耐受胃酸的能力。

3.4 丁酸梭菌的肠道消化酶耐受性

经过肠道消化酶处理后丁酸梭菌的活菌数显著低于对照组，这一结果与王腾浩[2]、欧阳志周等[5]的研究结果不一致，可能原因是本试验中试验饲粮提前在人工胃液中处理过，在这个过程中有部分芽孢被激活而转变为营养体，其抗逆性能减弱，继续接受肠道消化酶处理后，导致大量营养体被人工肠液中的消化酶破坏。将试验饲粮提前在人工胃液中处理能够最大限度地模拟试验饲粮在肉仔鸡体内的情况，因此可以推断丁酸梭菌在肉仔鸡肠道中对肠道消化酶的耐受性较低。

4 结　论

①在模拟饲料制粒高温条件下处理丁酸梭菌，其存活率随着处理时间延长而下降。

②在不同压力条件下处理丁酸梭菌，其存活率随压力上升而呈现降低趋势。

③丁酸梭菌对人工胃液有一定的耐受性。

④丁酸梭菌对肠道消化酶的耐受性较低。

参考文献：

[1] POPHAM D L.Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore:the inner wall of the lockbox[J].Cellular and Molecular Life Science,2002,59(3):426–433.

[2] 王腾浩.新型丁酸梭菌筛选及其对断奶仔猪生长性能和肠道功能影响的研究[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2015.

[3] 谢树贵.酒窖底泥中丁酸梭菌的分离及特性研究[D].硕士学位论文.武汉:华中农业大学,2007.

[4] 廖秀冬.丁酸梭菌的筛选及其对动物抗氧化能力和肉鸡肉品质影响的研究[D].博士学位

论文.北京:中国农业大学,2015.
[5] 欧阳志周,朱文,肖林,等.猪源丁酸梭菌分离及其对肠道绒毛发育的影响[J].齐鲁工业大学学报,2016,30(3):28–31.
[6] 孔青.丁酸梭菌培养与发酵动力学以及调节腹泻小鼠肠道菌群平衡的研究[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2006.
[7] 龚利敏,王恬.饲料加工工艺学[M].北京:中国农业大学出版社,2010:136–151.
[8] 过世东.饲料加工工艺学[M].北京:中国农业出版社,2010:133–135.
[9] 张铁鹰,汪儆,卢庆萍,等.肉仔鸡体外消化模拟技术的研究[J].中国农业科学,2007,40(11):2600–2606.
[10] 张铁鹰.植酸酶体外消化评定技术的研究[D].博士学位论文.北京:中国农业科学院,2002.
[11] 李凤娟.高压 CO_2 对枯草芽孢杆菌芽孢的灭活效能及机理研究[D].硕士学位论文.合肥:合肥工业大学,2013.
[12] 陈卫,谭惠子,胡斌,等.益生菌对消化道胃酸和胆盐胁迫的应激机理[J].中国食品学报,2010,10(6):1–6.

Tolerance of *Clostridium butyricum* in Feed Processing and Digestive Tract Environment of Broilers

JIA Li'nan CUI Jia CHEN Baojiang*

(*Collage of Animal Science and Technology*, *Hebei Agricultural University*, *Baoding* 071001, *China*)

Abstract: The aim of this study was to investigate the tolerance of *Clostridium butyricum* (*C.*

*Corresponding author, professor, E-mail: chenbaojiang@vip.sina.com （责任编辑 菅景颖）

butyricum) to adverse unsuitable environment in the process of pellet and in the digestive tract of broilers by simulating the condition of pellet and the environment of the digestive tract of broilers *in vitro*. The tolerance of *C. butyricum* to high temperature, high pressure, artificial gastric juice and intestinal digestive enzyme were evaluated, respectively. High temperature tolerance test: the experimental diet which contained *C. butyricum* was treated for 2.5, 5.0 and 7.5 min at 85 ℃, respectively, and the control group had no treatment. High pressure tolerance test: the experimental diet which contained *C. butyricum* was treated for 5 min at 0, 0.20, 0.30 and 0.40 MPa, respectively, and the control group had no treatment. Artificial gastric juice tolerance test: the experimental diet which contained *C. butyricum* was treated for 48 min in artificial gastric juice (pH=2.00, 3.00 and 4.00, respectively) and phosphate buffered saline (pH=2.00, as control group), respectively. Intestinal digestive enzyme tolerance test: the experimental diet which contained *C. butyricum* was firstly treated for 48 min in artificial gastric juice （pH=3.00）, and then treated for 198 min in intestinal digestive enzyme juice and phosphate buffered saline (pH=7.00, as control group), respectively. Each group had three replicates. After the test, the viable count of *C. butyricum* was measured by plate counting method, and the livability of *C. butyricum* was calculated. The results showed that the livability of *C. butyricum* was 70.43%, 52.69% and 46.35% by treating for 2.5, 5.0 and 7.5 min at 85 ℃, respectively. After treatment at 0.20, 0.30 and 0.40 MPa for 5 min, the livability of *C .butyricum* was 64.38%, 87.14% and 101.74%, respectively. The livability of *C. butyricum* was 113.27%, 123.07% and 78.52% by treating for 48 min in artificial gastric juice with the pH of 2.00, 3.00 and 4.00, respectively. The livability of *C. butyricum* was 47.71% after digestive enzyme juice treatment for 198 min. The results indicate that *C. butyricum* can tolerate high temperature and high pressure environment in feed processing, and has a better tolerance for artificial gastric juice, but has a lower tolerance for

intestinal digestive enzyme.

Key words: *C. butyricum*; tolerance; livability